

Die Bindung von Chlorpromazin, Thiopental,
Chinidin, Phenylbutazon und Propranolol an
Isoliertes Myosin von Kaninchenmuskel

Josef Zrenner
München 1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. W. Forth

Die Bindung von Chlorpromazin, Thiopental, Chinidin,
Phenylbutazon und Propranolol an isoliertes Myosin
von Kaninchenmuskel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Josef Zrenner

München, 1982



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.H.Kurz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.W.Forth

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

13. Mai 1962

GEWIDMET MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Problemstellung	1
II. Methodik	3
A) Herstellung von Myosin	3
Identitäts- und Reinheitsprüfungen	5
Herstellung der Myosinlösung	5
Substanzen und Nachweismethoden	6
B) Dialyse	7
Methodik	7
Hilfsmittel	8
Verfahren	9
Ansatzschema	11
III. Ergebnisse	12
IV. Diskussion	28
A) Kritik der Methode	28
Gewinnung von Myosin	28
Gleichgewichtsdialyse	28
Besonderheiten beim Arbeitsablauf	30
B) Diskussion der Ergebnisse	31
Beurteilung der in vitro-Bedingungen	31
Bindung an Myosin	32
Vergleich der prozentualen Bindung	32
Schlußfolgerungen	33
Bedeutung der ermittelten Werte	34
V. Zusammenfassung	35
VI. Literaturverzeichnis	36

I. PROBLEMSTELLUNG

Wer sich über die Bindung von Arzneimitteln an Proteine informieren will, dem wird auffallen, daß es eine ganze Menge Veröffentlichungen gibt, die die Proteinbindung an Plasmaproteine abhandeln (z.B. Bennhold et al. 1938, Goldstein 1949, Brodie et al. 1950, Scholtan 1964, Meyer u. Gutman 1968, Kriegelstein 1969, Curry 1970).

Er wird vergleichsweise wenige Abhandlungen finden, die sich mit der Bindung von Pharmaka an Gewebsproteine beschäftigen (z.B. van Praag and Simon 1966, Levine et al. 1968, Genazzani u. Santamaria 1969, Mc.Arthur et al. 1970, Höllt und Teschemacher 1975, Fichtl u. Kurz 1978). Dies verwundert, denn da im Gegensatz zum Gewebe das Plasma nur rund 5% der Körpermasse ausmacht, muß man annehmen, daß die Bindung im Gewebe einen größeren Einfluß hat als im Plasma (Schach v. Wittenau u. Delahunt 1966). Geht man noch weiter ins Detail, so wird man sehr wenig darüber finden, ob und wie die Bindung an die kontraktilen Proteine Myosin oder Actin erfolgt (z.B. Klein, noch unveröffentlicht, v. Nieciecki, noch unveröffentlicht).

Bedenkt man, daß nur der freie, also nicht proteingebundene Anteil eines Pharmakons wirksam ist, so fragt man sich, warum noch so wenig bekannt ist, ob Pharmaka an kontraktile Proteine gebunden sind, wie groß der gebundene Anteil an Myosin oder Actin ist, und welche Art von Bindung vorliegt.

Wie wenig bisher die Gewebsbindung berücksichtigt wurde, läßt sich unter anderem daran ersehen, daß sich in den Lehrbüchern die Werte für die Pharmakonbindung ausschließlich auf die Plasmabindung beziehen.

Auch das von Martin (1967) dargestellte Körpermodell bezieht sich ausschließlich auf Plasmabindung und läßt

die Muskelbindung vollkommen unberücksichtigt.

Mengenmäßig macht die Skelettmuskulatur etwa 40% des Körpergewichtes aus. Rund 75% davon sind Wasser, die festen Bestandteile setzen sich aus Proteinen zusammen, wobei die beiden kontraktile Proteine Actin und Myosin rund die Hälfte ausmachen.

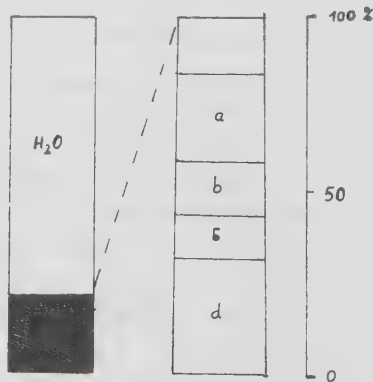


Abbildung I:

a) lösliche Proteine

b) sonstige Strukturproteine

c) Actin

d) Myosin

Zusammensetzung des Muskelgewebes. Die Abbildung links zeigt, daß Muskelgewebe aus ca. 25% festen Bestandteilen besteht. Die Abbildung rechts zeigt die prozentuale Zusammensetzung dieser festen Bestandteile.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob verschiedene Arzneimittel an das kontraktile Muskelprotein Myosin gebunden werden, und ob dabei Unterschiede zwischen sauren und basischen Pharmaka bestehen.

II. METHODIK

A. Herstellung von Myosin

Kaninchen werden durch Dekapitieren getötet, entblutet und nach Abziehen der Haut sofort für einige Minuten in Eiswasser getaucht. Alle weiteren Arbeiten erfolgten in einem Kühlraum von 2°C , um Eiweißzerstörung durch Bakterien zu verhindern. Rückenmuskulatur und weiße Muskeln aus beiden Hinterbeinen wurden anschließend präpariert, von Fett und Faszien befreit und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Muskeln durch einen vorgekühlten Fleischwolf mit Löchern von 2 mm Durchmesser gedreht.

Je 100 g des erhaltenen Muskelbreis wurden in 300 ml KCl/Phosphatpuffer (0,3 Mol/Liter KCl, 0,9 Mol/Liter $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,5) suspendiert (F.Guba und F.B. Straub 1943).

Die erhaltene Suspension wurde zehn Minuten mit einem Glasstab gerührt, die Temperatur dabei auf 0°C Celsius gehalten. Dabei quoll der Muskelbrei auf, und die Suspension wurde mit zunehmender Rührzeit immer homogener. Dann wurden 1200 ml dest. Wasser von 0°C hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension des Muskelbreis mehrmals durch ein gereinigtes, angefeuchtetes Leintuch filtriert. Sodann wurde das Filtrat durch eine Nutsche, die mit einer Schicht aus Papierbrei (zerkleinertes Filterpapier) bedeckt und an eine Absaugpumpe angeschlossen war, erneut gereinigt. Ausgefällt wurde das Myosin durch langsames Verdünnen mit 2000ml Eiswasser, die Micellenbildung wurde durch kräftiges Rühren mit einem Glasstab gefördert.

Nach ca. ein bis zwei Stunden konnte beobachtet werden, daß sich bei erfolgreicher Präparation nach dieser Zeit

ein seidiger Glanz bildete, der sich von der Flüssigkeitsoberfläche her verdichtete und allmählich nach unten sank. Nach einigen Stunden war das Myosin vollständig ausgefallen, d.h. es war ein Zweiphasengemisch entstanden. Weißes, seidig glänzendes Myosin lag am Boden des Gefäßes, darüber stand eine klare, gelblich gefärbte Flüssigkeit. Dann wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und anschließend der Niederschlag unter jeweils konstanten Bedingungen (10 Minuten zentrifugieren bei 1700×g) weiterverarbeitet.

Auf die anschließende Fällung von noch vorhandenem Actomyosin wurde verzichtet. Myosinlösungen sind nicht einheitlich, sondern enthalten mehrere Proteine (L-Myosin, S-Myosin, hochvisköses Actomyosin). Bei kurzer Extraktionsdauer erhält man Myosin A (geringe spezifische Viskosität), bei langer Extraktionsdauer Myosin B (Actomyosin).

Aus den obengenannten Gründen ist ersichtlich, warum genaues Einhalten von Temperatur, Arbeitszeit und Arbeitsbedingungen von entscheidender Bedeutung für die Gleichheit und Vergleichbarkeit der einzelnen Präparationen sind. Mit den Bindungsversuchen mittels Dialyse wurde erst begonnen, nachdem gewährleistet war, daß die Qualität verschiedener Präparationen hinreichend befriedigend und vergleichbar miteinander war. Die Myosinkonzentration bei den verschiedenen Versuchen lag zwischen 7,7 mg und 8,8 mg pro ml Puffer. Zu erwähnen ist hier noch, daß keine Metallgeräte oder Metallbehälter verwendet wurden, sondern Geräte aus Glas oder Quarz, da Myosin große Affinität zu Schwermetallen besitzt und so seine Struktur verändert würde.

Auf eine weitere Reinigung des Proteingemisches, z.B. durch Hinzufügen von Adenosintriphosphat (ATP) zur Lösung, um noch vorhandenes Actomyosin zum Verschwin-

den zu bringen, wurde verzichtet, da das Ziel dieser Arbeit in erster Linie war, herauszufinden, ob Pharmaka überhaupt an kontraktile Proteine, speziell Myosin gebunden werden (Medugorac 1975).

Identitäts- und Reinheitsprüfungen

Identität, Qualität und Reinheit wurden mittels Acetat- und SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermittelt.

Um den Wassergehalt des Präparates zu bestimmen, wurde bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank getrocknet. Zur Bestimmung des prozentualen Eiweißgehaltes wurde nach der Methode der Biuret-Eiweißbestimmung verfahren. Dies ist eine optische Bestimmungsmethode mit Reagentien der Firma Merck.

Dabei wurde die mit Kalilauge alkalisierte Eiweißlösung mit einigen Tropfen verdünnter Kupfer-II-Sulfatlösung versetzt und die entstehende Rot- bis Blauviolett-färbung fotometrisch ausgewertet.

Als Standard diente dabei gereinigtes Rinderalbumin.

Herstellung der Myosinlösung, die für die Bindungsversuche verwendet wurde

Im Kühlraum (+2°C) wurde durch ca. 15 Minuten langes vorsichtiges Rühren eine Lösung von gefällttem Myosin in einem "Lösungspuffer" (0,5 Mol/Liter KCl, 0,09 Mol/Liter K_2HPO_4/KH_2PO_4 in dest. Wasser) hergestellt. Der Puffer war auf einen pH von 7,0 eingestellt. pH 7,0 wurde gewählt, um die in vitro-Versuche dem physiologischen intrazellulären in vivo-pH des Muskels anzupassen (Waddel u. Bates 1969). Die erhaltene Eiweißlösung war eine feindisperse, kolloidale Lösung, die, abgefüllt im Dialysierschlauch, leicht trübe war. Die Konzentration dieser Lösungen variierte zwischen

36,7% und 44,2% Eiweiß.

Substanzen, bei denen die Bindung an Myosin untersucht wurde und deren Nachweismethoden

Substanz	Mol.Gew.	Eigenschaften
Thiopental-Natrium	264	Säure
Phenylbutazon	308	Säure
Chlorpromazinhydrochlorid	355	Base
Chinidin	324	Base
Propranolol	260	Base

Tabelle I:

Zusammenstellung der untersuchten Substanzen mit Molekulargewicht und Säure- bzw. Baseneigenschaften.

Nachweismethoden:

Thiopental

wurde nach der Methode von Brodie et al. (1950) bestimmt. Die Lösung wurde mit 1,5 Mol/Liter K_2HPO_4 -Puffer angesäuert, danach wurde mit Petroläther extrahiert. Die Reextraktion erfolgte mit 1 Mol/Liter Natronlauge. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 315 nm.

Phenylbutazon

wurde nach der Methode von Burns et al. (1953) bestimmt. Die Phenylbutazonlösung wurde mit 3 Mol/Liter Salzsäure angesäuert, dann wurde mit Heptan extrahiert und mit 2,5 Mol/Liter Natronlauge reextrahiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 265 nm.

Chlorpromazin

wurde nach der Methode von Salzmann und Brodie (1956) bestimmt. Die Pharmakonlösung wurde mit 2,5 Mol/Liter Natronlauge alkalisiert, anschließend wurde mit Petroläther extrahiert und mit 0,1 Mol/Liter Salzsäure wurde reextrahiert. Hier wurde die Absorption bei 252 nm gemessen.

Chinidin

Die Chinidinlösung wurde mit 0,1 Mol/Liter Natronlauge alkalisiert. Die Extraktion erfolgte mit Heptan, die Reextraktion mit 0,1 Mol/Liter Salzsäure. Absorptionsmessung bei 250 nm.

Propranolol

Zuerst wurde die Propranolollösung mit 1 Mol/Liter Natronlauge alkalisiert, danach mit Heptan extrahiert. Die Reextraktion erfolgte mit 0,1 Mol/Liter Salzsäure, die Absorptionsmessung bei 343 nm.

Die aufgeführten Substanzen wurden in 0,5 Mol/Liter KCl-Puffer gelöst, der mit 0,09 Mol/Liter K_2HPO_4 -Lösung auf pH 7,0 eingestellt war. Zur Bindungsbestimmung wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen der Außenflüssigkeit des Dialysiersystems zugesetzt. Es wurde jedesmal geprüft, ob die Substanzen in den verschiedenen Konzentrationen auch nach mehrstündiger Dialyse bei 2° bis 4°C noch in Lösung waren.

B. Dialyse

Methodik

Die Bestimmung des gebundenen Anteils der untersuchten Pharmaka erfolgte mittels Gleichgewichtsdialyse bei

pH 7 und 2°C. Die Gleichgewichtsdialyse (Friemel 1968) gilt als die klassische Methode für die Bestimmung der Proteinbindung. Kurz et al. (1977) verglichen in ihrer Arbeit "Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs" die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der wichtigsten Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung von Pharmaka und fanden heraus, daß die durch Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Werte den wirklichen Werten am nächsten kommen. Diese Untersuchungsmethode hat außerdem den Vorteil, daß sie bei relativ geringerem apparativen Aufwand die Untersuchung mehrerer Einzelproben nebeneinander zuläßt. So wurde ermöglicht, das Bindungsverhalten von Pharmaka in Lösungen verschiedener Konzentrationen an jeweils der gleichen Myosinlösung zu untersuchen.

Hilfsmittel

Bei der Dialyse dienten Visking-Dialysierschläuche vom Typ 8/32 als semipermeable Wand (10 mm breit und 0,05 mm Wandstärke, mittlere Porenweite 15 bis 20 x 10⁻⁸ cm).

Diese wurden vor ihrer Verwendung jeweils drei mal eine halbe Stunde lang in dest. Wasser gewaschen, um störende Substanzen zu entfernen (Kurz et al. 1977). Die Aufbewahrung, Knotung und Füllung erfolgte ebenfalls nach den von Kurz et al. (1977) veröffentlichten Methoden.

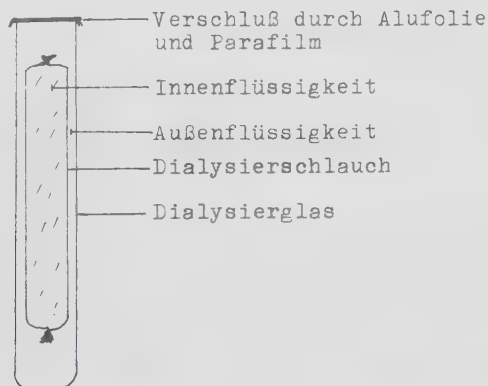
Die Dialyse, die bezüglich Zeit (jeweils 42 Stunden) und Temperatur (jeweils bei +2° bis +4°C) immer unter gleichen Bedingungen ablief, erfolgte in einer eigens angefertigten Wippe im Kühlraum. Bei dieser Methode wurde die in den Dialysierschläuchen befindliche Myosinlösung gleichmäßig von der "Pharmakon-Außenlösung" umspült. Dazu mußten die ca. 40 cm langen und 8,4 mm breiten Dialysiergläser, die mit "Pharmakon-Pufferlösung" als Außenflüssigkeit und "Myosin-Pufferlösung"

als Innenflüssigkeit beschickt waren, äußerst vorsichtig mit Aluminiumfolie und Parafilm verschlossen werden. Die Konzentration der Innenlösung lag dabei zwischen 36,7% und 44,2% Protein.

Verfahren

Die mit Puffer bzw. Eiweißlösung gefüllten Schläuche wurden prall gefüllt und zugeknotet. Die Einstellung des Dialysiergleichgewichts ließ sich dadurch beschleunigen, daß man die beiden Flüssigkeitsphasen (Innenflüssigkeit im Dialysierschlauch und Außenflüssigkeit zwischen Dialysierschlauch und Dialysierglas) langsam aneinander vorbeigleiten ließ. Dieser Effekt wurde durch eine Wippe erzielt. Verschiedene Überprüfungen zeigten, daß nach 40 Stunden das Dialysiergleichgewicht sicher erreicht war.

Versuchsansatz



Skizze I

Dialysierglas mit gefülltem Dialysierschlauch

Die Skizze zeigt ein Dialysierglas, in dem sich ein mit Proteinlösung (Innenflüssigkeit) gefüllter Dialysierschlauch befindet. Der Dialysierschlauch ist an beiden Enden durch Knoten verschlossen, er wird von der Außenflüssigkeit umspült. Der an Myosin gebundene Anteil des Pharmakons wurde indirekt ermittelt. Dies geschah durch Berechnung der Konzentration des freien Anteils und der Gesamtkonzentration der Substanz in der Eiweißlösung. Hierfür gab man zur Außenflüssigkeit eine genau bestimmte Menge Pharmakon. Man versetzte z.B. die 5 ml Pufferlösung mit Phenylbutazon in Konzentrationen von 3×10^{-4} , 10^{-4} und 3×10^{-5} Mol/Liter. Berechnen ließ sich der gebundene Anteil nach abgelaufener Dialyse, nachdem man zwei Werte ermittelt hatte:

Wert I: Konzentration des Pharmakons in der Außenflüssigkeit abzüglich "Blindwert" nach Dialyse im Ansatz Pharmakon/Myosin.

Wert II: Konzentration des Pharmakons in der Außenflüssigkeit abzüglich "Blindwert" nach Dialyse im Ansatz Pharmakon/Puffer.

$$\text{Nach der Formel } B = 100 - \frac{V_{\text{LW}} (E_1 - E_0) \times 100}{10 (E_2 - E'_0) - 5 (E_1 - E_0)}$$

ließ sich dann der gebundene Anteil in Prozent errechnen. Dabei bedeutet V_{LW} Volumen des Lösungswassers, E_0 Blindwert des Puffers, E_1 Konzentration des freien Anteils des Pharmakons und E_2 Konzentration der Gesamtmenge Pharmakon, E'_0 ist Blindwert der Myosinlösung.

Tabelle II:

Standardisiertes Ansatzschema

Innenflüssigkeit	Außenflüssigkeit	Extinktion der Außenflüssigkeit	Zur Bestimmung von
I Puffer	Puffer	E_0	Blindwert Puffer
II Puffer	Puffer + Pharmakon	E_2	Konzentration Gesamtmenge Pharmakon
III Myosin in Puffer	Puffer	E_0'	Blindwert der Myosinlösung
IV Myosin in Puffer	Puffer + Pharmakon	E_1	Konzentration des freien Anteils des Pharmakon

Für jeden Ansatz wurden die Mittelwerte aus den einzelnen Messungen gebildet. Nach Abschluß jeder Dialyse wurde der pH-Wert in der Innenflüssigkeit bestimmt. Dabei zeigte jeder überprüfte Fall auch nach Dialyse einen pH von 7,0.

III. ERGEBNISSE

In Tabelle III sind die Werte für die Bindung von Thiopental-Natrium in verschiedenen Konzentrationen aufgeführt. Bei dieser Versuchsreihe mit dem Natriumsalz von Thiopental wurden nur zwei verschiedene Konzentrationen, nämlich 2×10^{-4} und 6×10^{-5} Mol/Liter verwendet. Bei der Konzentration 6×10^{-4} Mol/Liter konnten keine Versuche durchgeführt werden, da sich nach abgelaufener Dialyse herausstellte, daß die Substanz im Lösungspuffer bei Dialysebedingungen von 2°C nicht in Lösung geblieben war.

Tabelle III:

Myosin pro ml Puffer	n	% gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-4} Mol/Liter	SE	n	% gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-5} Mol/Liter	SE
8,85 mg	5	16,65	$\pm 1,36$	6	20,55	$\pm 1,68$
8,65 mg	3	20,76	$\pm 1,42$	3	29,45	$\pm 2,20$
7,71 mg	8	16,90	$\pm 1,29$	8	18,42	$\pm 3,14$

Mittelwerte ($\bar{x}$) der Bindung von Thiopental an Myosin bei zwei verschiedenen Thiopentalkonzentrationen.

n: Anzahl der Versuche

SE: Standard Error

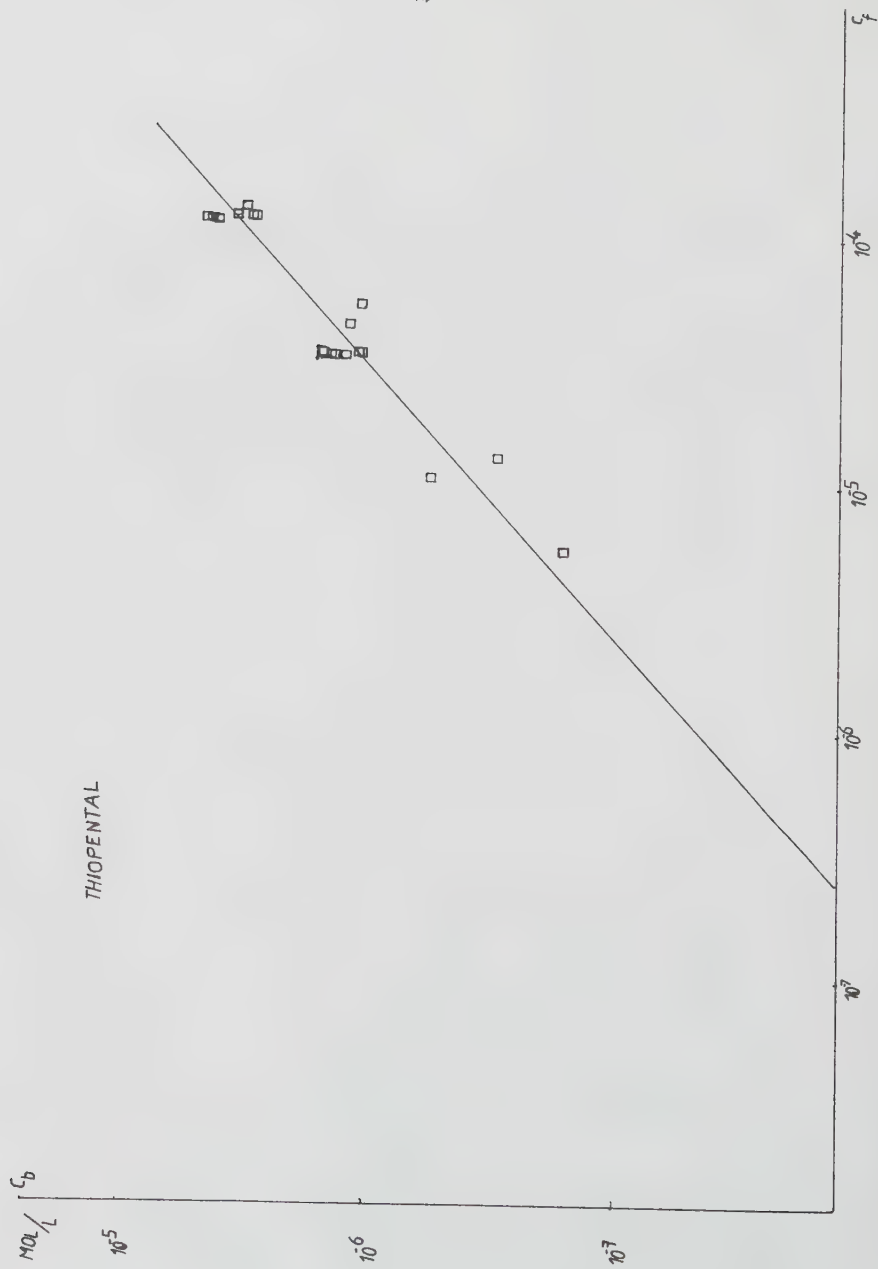


ABBILDUNG II

Abbildung II:

Abbildung II zeigt in graphischer Darstellung eine Zusammenstellung der Thiopentalversuchsreihen.

Es handelt sich um eine doppellogarithmische Darstellung. Auf der Abszisse wurde die Konzentration des freien Anteils von Thiopental (c_f) in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des gebundenen Anteils (c_b) in verschiedenen Konzentrationen.

In Tabelle IV sind die Bindungswerte für Phenylbutazon an Myosin in verschiedenen Konzentrationen aufgeführt. Es wurden zwei verschiedene Myosinkonzentrationen verwendet, nämlich 8,85 mg/ml Puffer und 7,52 mg/ml Puffer. Die Bindung von Phenylbutazon wurde in drei verschiedenen Konzentrationen ermittelt, nämlich 6×10^{-4} , 2×10^{-4} und 6×10^{-5} Mol/Liter.

Myosin pro ml Puffer	n	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-4}		SE	n	%gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-4}		SE	n	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-5}		SE
8,85 mg	6	12,99		$\pm 1,5$	6	24,99		$\pm 2,7$	6	59,71		$\pm 2,2$
7,52 mg	3	16,37		$\pm 4,2$	3	26,52		$\pm 2,1$	3	56,65		$\pm 4,7$

Tabelle IV:

Mittelwerte ($\bar{x}$) der Bindung von Phenylbutazon an Myosin bei drei verschiedenen Phenylbutazonkonzentrationen.

n: Anzahl der Versuche

SE: Standard Error

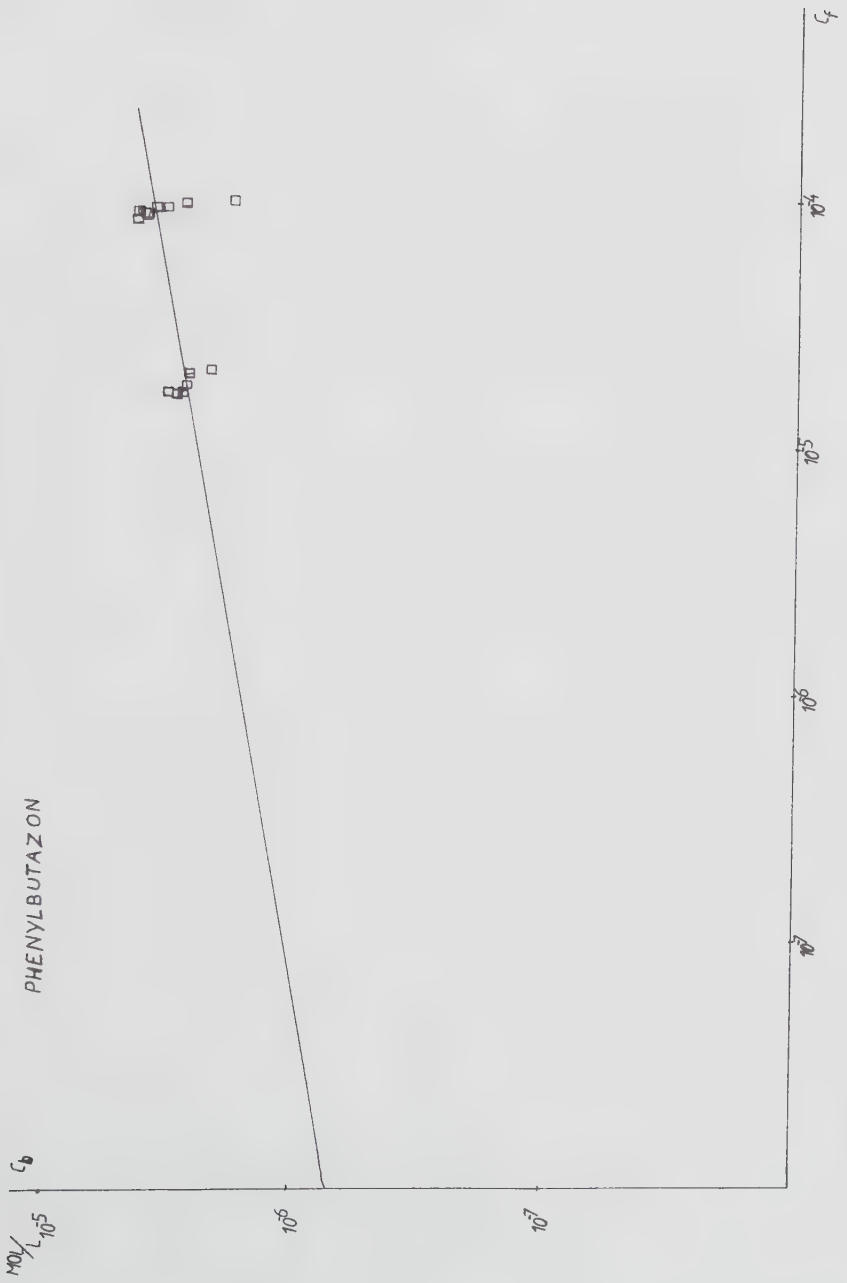


ABBILDUNG III

Abbildung III:

Abbildung III zeigt in graphischer Darstellung die Ergebnisse der Bindung von Phenylbutazon.

Es handelt sich um eine doppellogarithmische Darstellung. Die Abszisse zeigt die Konzentration des freien Anteils von Phenylbutazon (c_f) in verschiedenen Konzentrationen, die Ordinate stellt die Konzentration des gebundenen Anteils (c_b) in verschiedenen Konzentrationen dar.

Tabelle V gibt die Ergebnisse von Doppelbestimmungen mit Chinidin wieder. Hierbei wurden die Bindungswerte in fünf verschiedenen Konzentrationen von Chinidin ermittelt.

Konzentration Myosin pro ml Puffer	%gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-4}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-5}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-5}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-6}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-6}
8,65 mg	12,95	11,44	25,73	33,89	46,70
8,36 mg	---	9,51	5,94	14,48	17,96
8,46 mg	6,28	10,56	--	18,18	5,79

- 19 -

Tabelle V:

Mittelwerte ($\bar{x}$) der Bindung von Chinidin an Myosin bei fünf verschiedenen Chinidinkonzentrationen.

CHINIDIN

$\frac{\text{MOL}}{\text{L}}$ 10^{-5} 10^{-6}

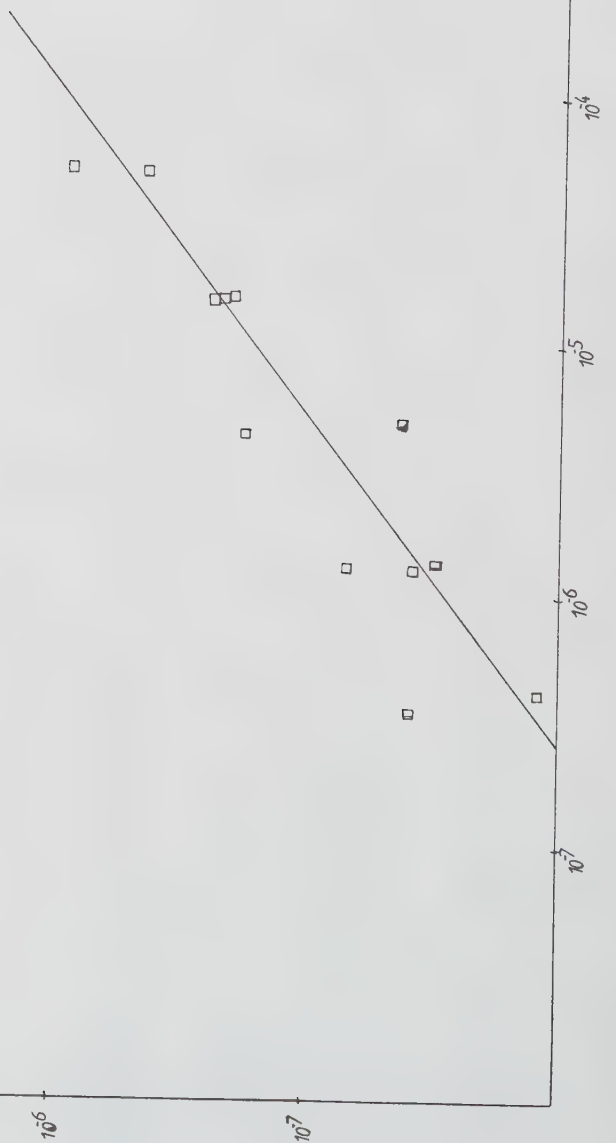


Abbildung IV:

Abbildung IV zeigt in graphischer Darstellung eine Zusammenfassung der Bindungsversuche an Chinidin.

Es handelt sich um eine doppellogarithmische Darstellung.

Abszisse: Konzentration des freien Anteils von Chinidin (c_f)

Ordinate: Konzentration des gebundenen Anteils von Chinidin in verschiedenen Konzentrationen (c_b)

In Tabelle VI wurde in Doppelbestimmungen die Bindung von Chlorpromazin an Myosin ermittelt.

Konz. Myosin pro ml Puffer	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-4}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 2×10^{-4}	%gebunden ($\bar{x}$) bei 6×10^{-5}
8,85 mg	18,53	30,79	72,82
7,53 mg	38,42	45,30	78,90

Tabelle VI:

Mittelwerte ($\bar{x}$) der Bindung von Chlorpromazin an Myosin bei drei verschiedenen Chlorpromazinkonzentrationen.

Die Angaben sind Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen.

Daher wurde keine Streuung angegeben.

Tabelle VII gibt die Ergebnisse der Bindung von Chlorpromazin an Myosin (CPZ/H^3) in sieben verschiedenen Konzentrationen wieder. Auch hier handelt es sich um Doppelbestimmungen.

Konz. Myosin pro ml Puffer	%gebunden ($\bar{x}$) bei $2,86 \times 10^{-4}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $8,57 \times 10^{-5}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $2,86 \times 10^{-5}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $8,57 \times 10^{-6}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $2,86 \times 10^{-6}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $8,57 \times 10^{-7}$	%gebunden ($\bar{x}$) bei $2,86 \times 10^{-7}$
8,65 mg	65,13	76,40	77,56	81,16	82,98	81,17	77,10
8,46 mg	59,20	70,66	77,50	78,82	75,56	79,67	66,32

Tabelle VII:

Es handelt sich um Mittelwerte aus nur zwei Bestimmungen, daher wurde keine Streuung angegeben.

Diese Versuchsreihe wurde mit markiertem Chlorpromazin (CPZ/H^3) durchgeführt.

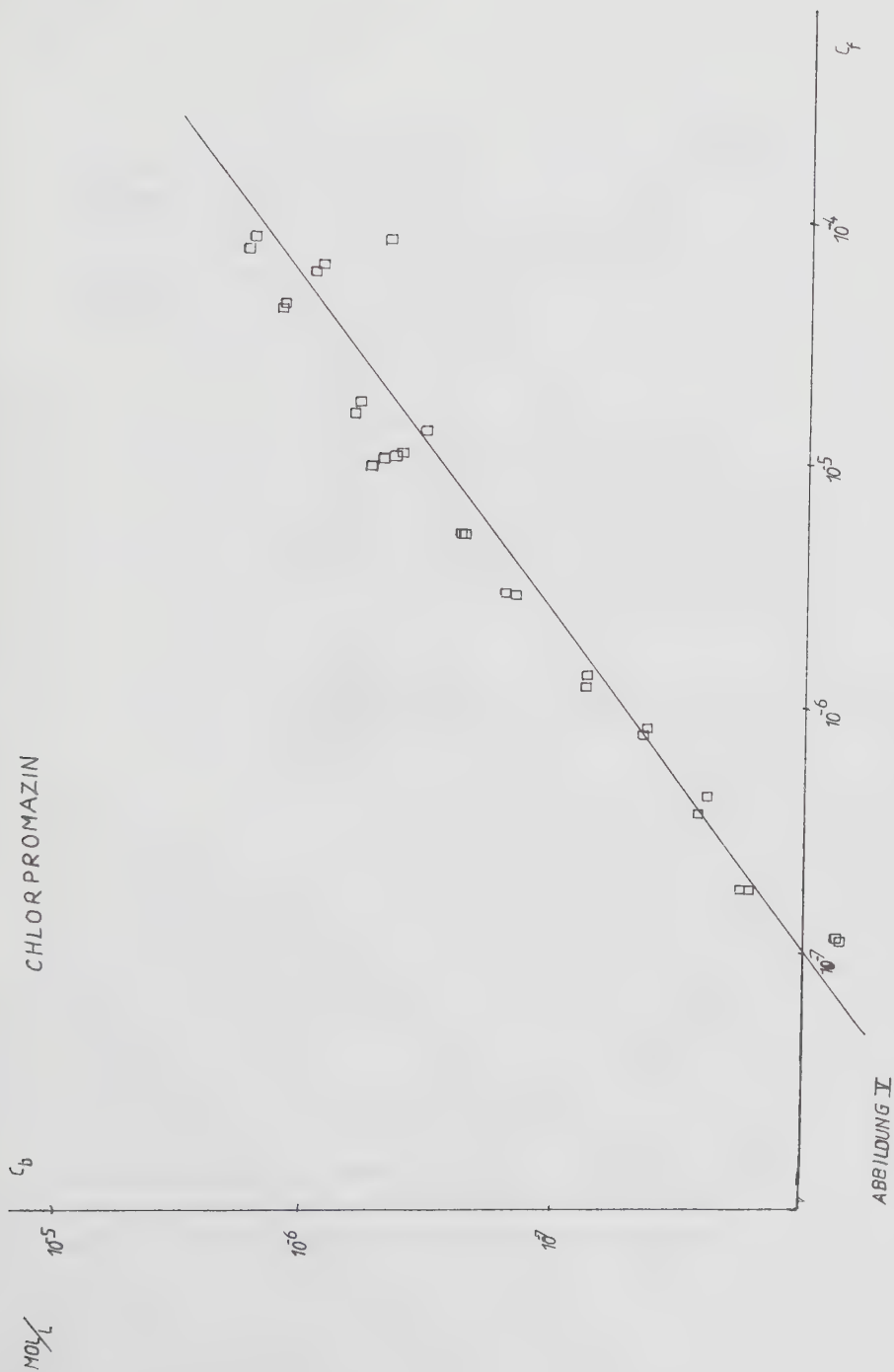


Abbildung V:

In Abbildung V sind in doppellogarithmischer Darstellung die Ergebnisse aller Bindungsversuche von Chlorpromazin graphisch dargestellt.

Auf der Abszisse findet sich die Konzentration des freien Anteils des Pharmakons (c_f), auf der Ordinate die Konzentration des gebundenen Anteils (c_b).

Die Myosinkonzentrationen in den verschiedenen Versuchsreihen lagen zwischen 8,45 und 8,70 mg/ml Puffer.

Die Bindungsversuche wurden mit Propranolol in den Konzentrationen 2×10^{-4} , 2×10^{-5} und 2×10^{-6} Mol/Liter durchgeführt.

Für alle durchgeführten Versuche gilt:

Keine Bindung von Propranolol an isoliertes Myosin.

Tabelle VIII:

Konzentration Myosin pro ml Puffer	($\bar{x}$) bei 2×10^{-4}	($\bar{x}$) bei 2×10^{-5}	($\bar{x}$) bei 2×10^{-6}
8,45 mg	4,2	-2,2	0
8,65 mg	0	2,0	0
8,70 mg	-4,0	0	0

Die Tabelle VIII zeigt, daß Propranolol nicht an Myosin gebunden wird.

Die Reinheit der Präparation wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese überprüft. Dabei wurde eine Reihe bekannter Proteine mit aufgetragen, anhand derer man das Molekulargewicht der erhaltenen Präparationen abschätzen konnte. Die SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresen wurden mit 8,5 %-igem Gel durchgeführt.

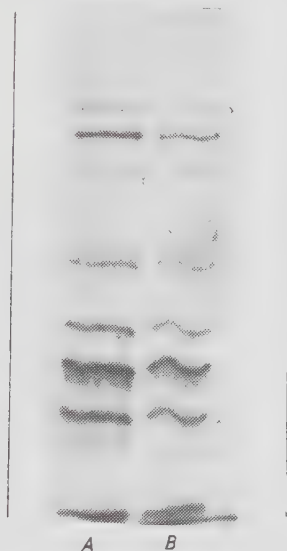


Bild I zeigt bei A Muskelhomogenat und bei B den Versuch einer Myosinpräparation. B wurde nicht für die Bindungsuntersuchungen verwandt, da das Präparat noch zu unrein war.

Die Abbildungen I bis III zeigen Beispiele für verschiedene Myosinpräparationen. Es ist deutlich zu erkennen, daß ein großer Unterschied in der Reinheit zwischen Präparat I B und Präparat II B besteht.

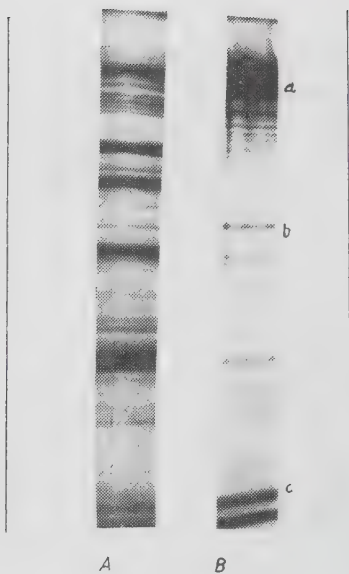


Bild II zeigt bei A Homogenat aus Kaninchenmuskel, bei B eine Myosinpräparation. Das Gel war überladen mit Protein, sodaß man Verunreinigungen besonders deutlich erkennen kann.

a: große Myosinuntereinheiten

b: Verunreinigungen

c: kleine Myosinuntereinheiten

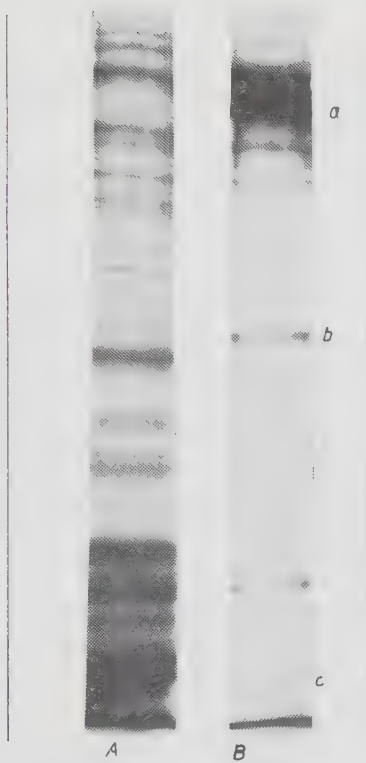


Bild III zeigt bei A Homogenat aus Kaninchenmüskel und bei B eine Myosinpräparation. Die großen Myosinuntereinheiten sind hier besonders deutlich zu sehen.

a: große Myosinuntereinheiten

b: Verunreinigung

c: kleine Myosinuntereinheiten

IV DISKUSSION

A Kritik der Methode

Gewinnung von Myosin

Von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der Versuche war die Präparation von Myosin. Dabei zeigte sich, daß die genaue Einhaltung eines standardisierten Arbeitsschemas sehr wichtig war. Vor allem die Einhaltung von Zeit und Temperatur war für die Gewinnung vergleichbarer Präparate entscheidend. So hatte beispielsweise beim Ausfällen des Myosins eine Temperaturerhöhung um nur wenige Grade zur Folge, daß das Myosin sehr verzögert oder gar nicht ausfiel. Tatsächlich entstanden erhebliche Anfangsschwierigkeiten, und Bild I zeigt, daß die damals erhaltenen Präparationen bei der Elektrophorese mehr Ähnlichkeit mit Muskelhomogenat hatten als mit Myosin.

Die Einhaltung einer konstanten Zeit war deswegen von Bedeutung, weil von ihr abhing, welches Myosingemisch erhalten wurde. Bei kurzer Extraktionszeit erhält man Myosin A, welches eine geringe spezifische Viskosität hat, bei langer Extraktionszeit entsteht Myosin B. Auf das Entfernen von Myosin B (Actomyosin) mit Hilfe von ATP wurde aus schon erwähnten Gründen verzichtet.

Gleichgewichtsdialyse

Bei der Wahl der Methode, mit der man die Proteinbindung von Pharmaka untersuchen will, stößt man auf mehrere praktikable Möglichkeiten. C.F.Chignell beschreibt 1971 in "Physical methods for studying drug protein binding" 19 verschiedene Methoden. In "Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs"

von H.Kurz et al. (1977) werden folgende Bestimmungsmethoden verglichen: Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Gelfiltration. Resümee der Arbeit: "Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse scheinen die durch Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Werte den wirklichen Werten am nächsten zu kommen."

Mit der Dialyse im allgemeinen und der Dialyse von Aminosäuren speziell befassen sich auch L.C.Craig, T.P. King (1966) und L.C.Craig, A.Ansevin (1963). Ihren Publikationen ist zu entnehmen, daß eine reversible Adsorption die Diffusionsrate durch Membranen beschleunigen kann. W.Scholten (1961) meint, daß durch Ultrafiltration exakte quantitative Werte nur bedingt erhältlich sind.

Die Wahl der Bestimmungsmethode fiel auf die älteste Methode zur Bestimmung der Proteinbindung, die Gleichgewichtsdialyse.

Für die Gleichgewichtsdialyse sprach auch, daß mit ihr eine größere Anzahl von Einzelproben nebeneinander untersucht werden konnte (verschiedene Pharmaka, verschiedene Konzentrationen). Folgende Fehlermöglichkeiten kommen bei der Gleichgewichtsdialyse in Betracht und können die Aussagewerte mindern (Garn und Kimbel 1961):

- I. Adsorption der Substanzen an die Dialysemembran
- II. Donnan-Effekt
- III. Veränderung der Eiweißkonzentration
- IV. Veränderung der Substanzkonzentration
- V. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle

Zu I

Hilzenbecher (1972) zeigte, daß Pharmaka in unterschiedlich starkem Ausmaß an die Dialysemembran adsorbiert werden und somit nicht mehr durch die Poren des Zelloloseschlauches diffundieren können. Dies könnte das Ergebnis der Gleichgewichtsdialyse verfälschen. Korrigieren läßt sich diese Fehlermöglichkeit, indem man

entsprechende Kontrollansätze (Pharmakon/Puffer) mitlaufen läßt.

Zu II

Der Donnan-Effekt konnte durch die Verwendung eines Phosphat-Puffers mit relativ hoher Ionenstärke klein gehalten werden.

Zu III

Da hier zwei verschieden stark konzentrierte Lösungen (Myosinlösung/Puffer-Pharmakonlösung) durch eine semipermeable Wand (Zellulosewand) voneinander getrennt sind, muß mit osmotischer Wasseranziehung gerechnet werden. Dies bedeutet eine Verdünnung der Myosinlösung. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, wurden alle Dialyseschläuche unter Druck verknotet.

Zu IV

Die Änderung der Substanzkonzentration spielt keine entscheidende Rolle.

Zu V

Die Blockade der Membranpassage wird verhindert, indem man einen ungehinderten Durchtritt durch die Membranporen ermöglicht. Der ungehinderte Durchtritt war gewährleistet, da nach Zugabe des Pharmakons zur Außenlösung (Puffer/Pharmakon) wie nach Zugabe zur Innenflüssigkeit ein Gleichgewicht erreicht war.

Besonderheiten beim Arbeitsablauf

Die jeweiligen Versuche mußten parallel, d.h. gleichzeitig ablaufen, da es nicht möglich war, frisch präpariertes Myosin für einige Tage zu lagern, ohne dabei Gefahr zu laufen, daß sich das erhaltene Myosin in seiner Konsistenz verändert. Versuche, das Myosin gefrierzutrocknen, scheiterten unter anderem daran, daß es nicht gelang, gefriergetrocknetes Myosin in entsprechender Form wieder in Lösung zu bringen. Bei kühlgelagertem

Myosin, das nicht lyophilisiert war, konnte man nach ca. drei Tagen eine Veränderung der Farbe (von weiß nach gelb) und einen unangenehmen Geruch feststellen, was beides auf eine Zerstörung des Myosins durch Bakterien zurückzuführen war.

Entsprechend der Aufgabenstellung, herauszufinden ob überhaupt Pharmaka an Myosin gebunden werden, wurde die Dialyse mit dem Pharmakon Thiopental in nur zwei verschiedenen Konzentrationen (2×10^{-4} und 6×10^{-5}) begonnen. Als feststand, daß Pharmaka an Myosin gebunden werden, wurden weitere Substanzen (Säure, Base) in die Versuchsreihen einbezogen. Außerdem wurden die Konzentrationen der Pharmaka auf mindestens drei erweitert.

Später wurde im Rahmen dieser Arbeit noch versucht herauszufinden, ob eine Konzentrationsabhängigkeit des Pharmakons bei der Bindung an Myosin besteht. Das Problem der begrenzten Haltbarkeit von Eiweißlösungen wurde bereits erwähnt.

Daß sich bei längerer Lagerung infolge Denaturierung das Bindungsverhalten verändern kann, ist Arbeiten von Scholtan (1961) und Baur, Kurz und Trunk (1977) zu entnehmen. Dieses Problem wurde gelöst, indem jeweils frisch gefälltes Myosin sofort verarbeitet wurde. Die Dialyse erfolgte bei 2°C im Kühlraum. Durch pH-Kontrollen am Ende der Dialyse wurde geprüft, ob pH-Änderungen infolge Proteolyse eingetreten waren. Die Kontrollen vor und nach Ablauf der Dialyse ergaben pH-Konstanz.

B Diskussion der Ergebnisse

Beurteilung der in vitro-Bedingungen

Die hier ermittelten Bindungswerte gelten für in vitro-Verhältnisse. Diese sind nicht immer mit in vivo-Werten

identisch, denn in vivo spielen auch Mechanismen eine Rolle, die in vitro nicht von Bedeutung sind. Erwähnt sei hier als Beispiel der "aktive Transport". R.Kuntzman et al. (1967) berichten in einer Publikation, bei der sie allerdings mit Muskelhomogenat gearbeitet haben, daß die in vitro gemessenen Bindungswerte geringer waren, als dies zu erwarten war.

Bindung an Myosin

Die Tabellen III bis VII zeigen, daß Pharmaka an Myosin gebunden werden. Der prozentual gebundene Anteil der einzelnen Substanzen an Myosin ist verschieden groß.

Das Pharmakon Propranolol zeigt in keiner der sechs verschiedenen Versuchsreihen eine Bindung an Myosin. Es ist interessant, daß mit Propranolol eine Substanz gefunden wurde, die nicht an isoliertes Myosin gebunden wird. In seiner Arbeit "Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe" (1974) untersucht B.Fichtl die Bindung von 22 verschiedenen Substanzen an menschliches Muskelhomogenat. Jede der gewählten Substanzen zeigte Bindung an das Muskelhomogenat. Auch bei der Arbeit von Klein et al. wird Propranolol an Actin gebunden.

Vergleich der prozentualen Bindung bei den einzelnen Substanzen und Beurteilung

Von den untersuchten Substanzen zeigt das Chlorpromazin deutlich die prozentual stärkste Bindung an Myosin. Bei einer Konzentration an freiem Chlorpromazin (CPZ) von 6×10^{-5} Mol/Liter und bei einer Proteinkonzentration von 8,2 mg ($\pm 0,7$ mg) lagen die Werte zwischen 70% und 80% Bindung. In einer Versuchsreihe mit markiertem CPZ (CPZ/H^3), bei der die Myosinkonzentration bei 8,65 mg/ml und die CPZ/H^3 -Konzentration zwischen $2,86 \times 10^{-4}$ und $2,86 \times 10^{-7}$ Mol/Liter war, ergaben sich Bindungswerte zwischen 65% und 83%. Der graphischen Darstellung ist

zu entnehmen, daß bei doppelt logarithmischem Maßstab über einen weiten Konzentrationsbereich hinweg eine lineare Beziehung zwischen den Logarithmen der gebundenen Menge und der freien Konzentration besteht. Die Bindung von CPZ an Actin ist aber noch deutlich größer, wie der Arbeit "Bindung von Pharmaka an die Gewebsproteine Actin und Myosin" von Klein et al. (1979) zu entnehmen ist. Wenn man aber berücksichtigt, daß intakte Muskeln rund drei mal mehr Myosin als Actin enthalten, so läßt sich abschätzen, daß die Gesamtmenge, die an Myosin gebunden wird, größer sein kann, als beim Actin. Die Tabellen III und V zeigen, daß Thiopental und Chiniadin in wesentlich geringerem Umfang gebunden werden als CPZ. Bei Phenylbutazon lag die Bindung bei einer Myosinkonzentration von 8,85 mg/ml zwischen 13% und 60%.

Schlußfolgerungen aus dem Vergleich der Bindung an Myosin und an homogenisierten und intakten Muskel

Die hier untersuchten Substanzen werden auch an homogenisierten und intakten Muskel gebunden. In Tabelle IX ist eine Rangordnung der Bindung für die verschiedenen Substanzen abgebildet.

Tabelle IX: Rangordnung der Bindung

Intakter Muskel	(CPZ)	(PRO)	(TPL)	(PBZ)
Homogenisierter Muskel	(CPZ)	(PRO)	(TPL)	(PBZ)
Actin	(CPZ)	(PBZ)	(TPL)	(PRO)
Myosin	(CPZ)	(PBZ)	(TPL)	(CHI)

Tabelle IX:

Diese Tabelle ist der Publikation von Klein et al. (März 1979) entnommen. (CPZ) bedeutet Chlorpromazin, (PRO) bedeutet Propranolol, (PBZ) steht für Phenyl-

butazon, (TPL) für Thiopental und (CHI) für Chinidin. Sowohl beim Actin wie auch beim Myosin ist die Reihenfolge der Bindung: Chlorpromazin am meisten gebunden, gefolgt von Phenylbutazon, Thiopental und Propranolol, wobei letztere Substanz an Myosin überhaupt nicht gebunden wird. Beim Muskelhomogenat und beim intakten Muskel dagegen wurde zwar auch (CPZ) am meisten gebunden, bei den anderen drei Substanzen aber war die Reihenfolge gerade umgekehrt.

Bedeutung der ermittelten Werte

Bereits in der Diskussion wurde darauf hingewiesen, daß die hier gefundenen Werte unter in vitro-Bedingungen ermittelt wurden. Eine vorbehaltlose Übertragung auf in vivo-Bedingungen ist nicht statthaft. Man darf jedoch annehmen, daß im lebenden Organismus die untersuchten Substanzen ähnlich stark gebunden werden, wie dies hier der Fall war, wenn man die Arbeit von Kuntzman et al. (1967) berücksichtigt. Vergleicht man die Bindung der hier untersuchten Substanzen an Myosin mit ihrer Bindung an Plasma oder an Hämoglobin (Hilzenbecher 1972), so ist sie jeweils geringer. Dies gilt auch im Vergleich mit der Bindung an Actin (Klein, unveröffentlicht).

Bei der großen Menge Myosin im Körper wird die Pharmakonbindung an Myosin aber eine entscheidende Rolle spielen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- I. Myosin wurde durch Fällungsmethoden aus Kaninchenmuskeln gewonnen.
- II. Der Reinheitsgrad der Präparationen wurde durch Elektrophorese überprüft, die Bindung wurde durch Gleichgewichtsdialyse bei $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+4^{\circ}\text{C}$ bestimmt.
- III. Das kontraktile Protein Myosin ist in der Lage, Pharmaka zu binden.
- IV. Die Bindung von Pharmaka an Muskelgewebe läßt sich nicht alleine durch die Bindung an die kontraktile Proteine erklären. Vermutlich sind auch noch Lipide und (oder) andere Proteine an der Bindung beteiligt.
- V. Die verschiedenen Pharmaka werden unterschiedlich stark gebunden, und zwar in folgender Reihenfolge: Chlorpromazin wird am stärksten an Myosin gebunden, gefolgt von Phenylbutazon, Thiopental und Chinidin.
- VI. Das Pharmakon Propranolol war das einzige untersuchte, das keinerlei Bindung an Myosin zeigte. Hierin unterscheidet sich Myosin auch vom Actin, bei dem eine Bindung von Propranolol festzustellen ist.

Literaturverzeichnis

- 1 Baur, G., Kurz, H., Trunk, H.
Alteration of protein-binding during storage of human
plasma preparations
Anaesthesist 26, 148-150 (1977)
- 2 Bennhold, H., Kylin, E., Rusznyak, St.
Die Eiweißkörper des Blutplasmas S. 230-303
Verlag Th. Steinkopff, Dresden, Leipzig (1938)
- 3 Brodie, B.B., Axelrod, J.
The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods
for the estimation of aminopyrine and its metabolites
in biological material
J. Pharmacol. 99, 171-184 (1950)
- 4 Brodie, B.B., Mark, L.C., Papper, E.M., Lief, P.A., Bern-
stein, E., Rovenstine, E.A.
The fate of thiopental in man and a method for its
estimation in biological material
J. Pharmacol. 98, 85-96 (1950)
- 5 Burns, J.J., Rose, R.K., Chenkin, T., Gollman, A., Schulert, A.,
Brodie, B.B.
The physiological disposition of phenylbutazone in man
and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. 109, 346-357 (1953)
- 6 Chignell, C.F.
Physical methods for studying drug protein binding
Hbd. d. exp. Pharmakologie XXVIII/1, 187-212 (1971)
Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

- 7 Craig, I.C., King, T.F.
Dialysis
Methods of biochemical analysis, Vo. IX, ed. D. Glick
Interscience Publ., New York, London, Sydney (1966)
- 8 Craig, I.C., Ansevin, A.
Dialysis studies VI: experiments with amino acids
Biochemistry 2, 1268-1271 (1963)
- 9 Curry, S.H.
Plasma protein binding of chlorpromazine
J. Pharm. Pharmacol. 22, 193-197 (1970 a)
- 10 Curry, S.H.
Theoretical changes in drug distribution resulting from
changes in binding to plasma proteins and to tissues
J. Pharm. Pharmacol. 22, 753-757 (1970 b)
- 11 Fichtl, B.
Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe
Dissertation, S. 10-15 (1974) Pharmakolog. Institut
München
- 12 Fichtl, B., Kurz, H.
Binding of drugs to human muscle
Europ. J. clin. Pharmacol. 14, 335-340 (1978)
- 13 Friemel, G.
Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine
verschiedener Tierarten
Dissertation München (1968), Pharmakol. Institut
- 14 Garn, F.W., Kimbel, K.H.
Verbleib und Ausscheidung von Depot-Sulfonamiden
Arzneimittelforschung 11, 701-707 (1961)

- 15 Genazzani, E., Santamaria, R.
Interaction of cardiac glycosides with serum albumin
and contractile proteins
Pharmacol. Res. Commun. 1, 249-257 (1969)
- 16 Goldstein, A.
The interaction of drugs and plasma proteins
Pharmacol. Rev. 1, 102-165 (1949)
- 17 Guba, F., Straub, F.B.
Studies 3, 46-49 (1943)
- 18 Hilzenbecher, C.
Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin
Dissertation Pharmakolog. Institut der Universität
München (1972)
- 19 Höllt, V., Teschemacher, H.J.
Hydrophobic interactions responsible for unspecific
binding of morphine-like drugs
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288 163-177 (1975)
- 20 Kauzmann, W.
Some factors for the interpretation of protein dena-
turation
Advanc. Prot. Chem. 14, 1-63 (1959)
- 21 Klein, A., Zrenner, J., Fichtl, B., Kurz, H.
Bindung von Pharmaka an die Gewebsproteine Actin und
Myosin
Naunyn-Schmiedeberg's, Arch Pharmacol. 307, 1979 Suppl.
- 22 Klein, A., unveröffentlicht

- 23 Kriegelstein, J.
Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Klinische Wochenschrift 47, 1125-1130 (1969)
- 24 Kuntzman, R., Tsai, I., Burns, J.J.
Importance of tissue and plasma binding in determining
the retention of norchlorcyclizine and nrcyclizine
in man, dog and rat
J.Pharmacol. 158, 332-339 (1967)
- 25 Kurz, H.
Analytische Probleme bei der Bestimmung der Protein-
bindung durch Ultrafiltration, Ultrazentrifugation
und Dialyse
Beilage zu einem Teil der Auflage der Fresenius Zeit-
schrift für analytische Chemie, Band 252:Heft 4/5 (1970 a)
- 26 Kurz, H.
Eignung von Verteilungsmethoden zur Beurteilung der
Permeation von Arzneimitteln durch biologische Membranen
Beilage zu einem Teil der Auflage der Fresenius Zeit-
schrift für analytische Chemie, Band 252:Heft 4/5 S.9
(1970 b)
- 27 Kurz, H., Trunk, H., Weitz, B.
Evaluation of methods to determine protein-binding of
drugs
Arzneim.-Forschung/Drug Res. 27 (II), 7, 1373-1380 (1977)
- 28 Levine, R.J.C., Teller, D.N., Denber, H.C.B.
Binding of chlorpromazine and thiopropazine in vitro
Mol.Pharmacol. 4, 435-444 (1968)

- 29 Martin, B.K.
Potential effect of the plasma proteins on drug
distribution
Nature 207, 275-276 (1967)
- 30 Mc Arthur, J.N., Dawkins, P.D., Smith, M.J.H.
The relation between circulating and tissue concen-
trations of salicylate in the mouse in vivo
J.Pharm.Pharmacol. 22, 801-805 (1970)
- 31 Medugorac, I.
Significance and problems of the pure production
of myosin (1975), Instrum.Forsch., 4, 22-30
- 32 Meyer, M.C., Guttman, D.E.
The binding of drugs by plasma proteins
J.Pharmaceut.Sci. 57, 895-916 (1968)
- 33 v.Nieciecki, A., unveröffentlicht
- 34 Salzmann, P.N., Brodie, B.B.
Physiological disposition and fate of chlorpromazine
and a method for its estimation in biological material
J.Pharmacol.118, 46-54 (1956)
- 35 Schach v.Wittenau, M., Delahunt, C.S.
The distribution of tetracyclines in tissues of
dogs after repeated oral administration
J.Pharmacol.152, 164-169 (1966)
- 36 Scholtan, W.
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper
Arzneimittel-Forschung 14, 469-473 (1964)

- 37 Scholtan, W.
Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Eiweißkörper
des Serums
Arzneimittel-Forschung 11, 707-720 (1961)
- 38 Waddel, W.J., Bates, R.G.
Intracellular pH
Physiolog.Rev. 49 , 285-329 (1969)

Herrn Prof.Dr.Kurz möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen herzlich danken.

Herrn Prof.Dr.M.Kiese danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, Herrn Prof.Dr.W.Forth danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer Dank gilt den Herren Dr.B.Fichtl, Dr.D.Wildenauer und A.v.Nieciecki, die mit sachverständigen Anregungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Schließlich danke ich noch meiner Frau Christine für Tips und Anregungen beim Zusammenstellen der Arbeit sowie für die Erledigung der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Am 2. Februar 1947 wurde ich als Sohn des Abteilungsdirektors Josef Zrenner und seiner Frau Barbara, geb. Seitz, in Berching (Oberpfalz) geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Berching, Schmidmühlen, Regensburg und Rothenburg/Tbr. Nach 5-jährigem Volksschulbesuch trat ich ins Humanistische Gymnasium in Regensburg ein. Bedingt durch Versetzungen des Vaters besuchte ich anschließend die Oberrealschule in Rothenburg/Tbr. und das Willstätter-Gymnasium in Nürnberg. Dort legte ich 1969 das Abitur ab.

1969 begann ich mit dem Praktikum als Apothekerpraktikant bei Herrn Dr. Leetsch in München. Von 1972 an studierte ich Pharmazie an der Philosophisch Theologischen Hochschule in Passau und an der Ludwig Maximilians-Universität München.

1975 Staatsexamen in Pharmazie

1975 bis 1980 Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München, wo ich im Dezember 1980 das medizinische Staatsexamen bestand. Für meine Dissertationsarbeit war ich von Ende 1976 bis Anfang 1982 am Pharmakologischen Institut der Universität München tätig.

Vom 1. April 1981 bis Mitte November war ich als Assistenzarzt in der 1. Kinderklinik des Schwabinger Krankenhauses in München beschäftigt.

Seit Mitte November 1981 arbeite ich als Assistenzarzt in der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Neu-markt/Opf.

